

Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского
Серия «Биология, химия». Том 20 (59). 2007. № 3. С. 79-86.

УДК 582.594.2:581.143.6

КУЛЬТУРА ПЫЛЬНИКОВ ОРХИДНЫХ *IN VITRO* И ЕЕ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ

Теплицкая Л.М., Шейко Е.А., Лобко В.Н.

Получены каллусные культуры из пыльников 5 видов орхидных флоры Крыма. Показана зависимость процесса каллусогенеза от генотипа и фитогормонального состава питательной среды. Цитоморфологический анализ каллусных культур показал их высокий морфогенетический потенциал, в связи с присутствием меристематических очагов, гистогенеза и эмбриогенеза.

Ключевые слова: орхидные, каллусная культура, пыльники *in vitro*.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важнейших проблем является сохранение биологического разнообразия природных флор, в том числе редких и исчезающих видов, к которым относятся представители семейства Орхидных. Актуальным является разработка методов ускоренного размножения, введения в культуру, репатриация этих видов в природные места обитания, а также создание генетических банков и коллекций, для сохранения и расширения генофонда.

Перспективным направлением в этой области является разработка биологических подходов культивирования *in vitro* как вегетативных, так и генеративных структур, таких как пыльник, завязь и семязачаток, так как они имеют высокий морфогенетический потенциал и обладают определенной автономностью от материнского растения. Суть такого процесса заключается в переключении программы развития морфогенетически компетентных клеток генеративных структур с обычного гаметофитного пути на иной путь – спорофитный, то есть образования растения – регенеранта [1,2,3].

Универсальность путей морфогенеза в естественных условиях и культуре *in vitro* позволяет выбрать модель для экспериментального изучения основных закономерностей и путей морфогенеза. Такой моделью может служить пыльник. Исследования морфогенетического потенциала клеток пыльника *in vitro* вносят определенный вклад в решение проблемы воспроизведения и размножения цветковых растений. Особенно важное значение приобретают эти исследования для создания высокоэффективных технологий массового получения растений редких, исчезающих, эндемичных видов.

Целью работы была оптимизация условий культивирования пыльников 5 видов орхидных крымской флоры, получение каллусной культуры и изучение ее морфогенетического потенциала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для проведения исследований служили дикорастущие виды орхидных (*Orchidaceae*) флоры Крыма: *Orchis simia* Lam. – ятрышник обезьяний, *Anacamptis pyramidalis* (L.) Rich – анакамптис пирамидальный, *Orchis purpurea* Huds. – ятрышник пурпурный, *Eripactis helleborine* (L.) Crantz – дремлик широколистный, *Cephalanthera damasonium* (Mill) Druce – пыльцеголовник крупноцветковый.

Пыльники отбирали из нераскрывшихся бутонов (накануне цветения) и после стерилизации на питательные среды. Культивировали пыльники в колбах на агаризованных питательных средах, дополненных бензиламинопурином (БАП), кинетином (2,4-дихлорфеноксикусной кислотой (2,4-Д)), индолилмасляной кислотой (ИМК). Условия культивирования: температура 23 - 25°C, освещенность 2 – 3 тыс. люкс при 10 часовом фотопериоде, относительная влажность воздуха составляла 60 %. Цитологические исследования проводили на временных окрашенных ацетокармином препаратах [4,5]. Микроскопические исследования проводили на микроскопах МБИ – 3 ($\times 8$, $\times 20$, $\times 90$). Микрофотографии сделаны при помощи фотонасадки МФНЭ – 1, на фотопленку «Kodak – 200»

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культивирование растений *in vitro* для получения каллуса и растений – регенерантов невозможно без получения асептической культуры. В наших исследованиях были опробованы два способа стерилизации. На начальных этапах проведения эксперимента планировалось подобрать такие стериленты и режимы стерилизации, чтобы получить максимальный выход стерильного материала, при минимальной гибели эксплантов от жесткого режима стерилизации. Для соблюдения условий асептики работу по введению эксплантов в изолированную культуру выполняли в условиях ламинарного бокса. Поверхностную стерилизацию материала проводили 0,8% $\text{Ag}(\text{NO}_3)_2$ – (5 минут), 0,8% $\text{Ag}(\text{NO}_3)_2$ (2 минуты) вместе с 70% этианолом (1 минута), 70% этианолом (1 минута) (табл. 1).

Как видно из данных таблицы 1, наибольшей стерильности при получении асептических эксплантов генеративных органов орхидей изученных видов удалось достичь при использовании двойной стерилизации с 0,8% $\text{Ag}(\text{NO}_3)_2$ и 70% этианолом в течении 2 и 1 минут соответственно. Количество асептических эксплантов при данном методе стерилизации составило от 89,3% у *C. damasonium* до 100% у *O. simia*. При этом максимальный процент жизнеспособных эксплантов составил для пыльников у *E. helleborine* 4,1%, а наименьший процент жизнеспособных эксплантов у *O. purpurea* 0,9%. При использовании 0,8% азотнокислого серебра (5 минут) процент асептических эксплантов был высок (от 98,4 до 70,5% у изученных видов), однако количество жизнеспособных эксплантов составило от 5,4 до 10,5%, что не удовлетворяло нашим требованиям. Оптимальным способом стерилизации пыльников изученных видов орхидных было использование 70% этианола с экспозицией 1 минута. Несмотря на то, что при этом процент асептических эксплантов оказался ниже, чем при использовании вышеуказанных приемов (стерильность составила в среднем 67,7% для всех эксплантов), в дальнейшей работе использовалась именно эта стерилизация, так как

КУЛЬТУРА ПЫЛЬНИКОВ ОРХИДНЫХ IN VITRO

показатель жизнеспособности эксплантов был высок, и составил от 98,5% (*A. pyramidalis*), до 62,2% (*C. damasonium*).

Важным методическим моментом в разработке методов культуры *in vitro* является подбор питательной среды с оптимальной концентрацией регуляторов роста для индукции каллусогенеза. В ходе проведения эксперимента нами были опробованы пять основных питательных сред: Мурасиге-Скуга, Гамборга-Эвелега В5, Нича, Нич и Потата II. Состав среды был модифицирован для индукции каллусогенеза, чтобы в короткие сроки получить первичную каллусную ткань. В качестве основных дедифференцирующих факторов Бутенко, Круглова рекомендуют использовать природные фитогормоны и их синтетические аналоги: 2,4-Д, ИМК, 6-БАП [6, 7]. Данные регуляторы роста использовались в концентрациях от 0,5 мг/л до 3,0 мг/л.

Таблица 1.

Влияние различных стерилентов и режимов стерилизации на получение асептической культуры и жизнеспособность пыльников орхидных *in vitro*

Объект исследования	Стериленты и режимы стерилизации	Количество асептических эксплантов, %	Количество жизнеспособных эксплантов, %
<i>A.pyramidalis</i> Анакамптис пирамидальный	0,8% Ag(NO ₃) ₂ 5 мин	97,5	5,5
	0,8% Ag(NO ₃) ₂ 2 мин, 70% этанол, 1 мин	92,5	12,3
	70% этанол, 1 мин	25,0	98,5
<i>O. simia</i> Ятрышник обезьяний	0,8% Ag(NO ₃) ₂ 5 мин	97,0	7,0
	0,8% Ag(NO ₃) ₂ 2 мин, 70% этанол, 1 мин	99,9	1,0
	70% этанол, 1 мин	77,8	80,6
<i>O. purpurea</i> Ятрышник пурпурный	0,8% Ag(NO ₃) ₂ 5 мин	96,8	7,6
	0,8% Ag(NO ₃) ₂ 2 мин, 70% этанол, 1 мин	98,9	0,9
	70% этанол, 1 мин	75,1	79,3
<i>E. helleborine</i> Дремлик широколистный	0,8% Ag(NO ₃) ₂ 5 мин	86,4	7,3
	0,8% Ag(NO ₃) ₂ 2 мин, 70% этанол, 1 мин	95,2	4,1
	70% этанол, 1 мин	70,0	82,7
<i>C. damasonium</i> Пыльцеголовник крупноцветковый	0,8% Ag(NO ₃) ₂ 5 мин	70,5	10,5
	0,8% Ag(NO ₃) ₂ 2 мин, 70% этанол, 1 мин	89,3	2,9
	70% этанол, 1 мин	88,2	65,2

Полученные нами данные, однако, позволили сделать вывод о том, что из всех сред наиболее пригодной для культивирования пыльников изучаемых видов является среда Нича и Нич с различными концентрациями регуляторов роста. При культивировании генеративных органов на остальных средах во всех вариантах наших исследований получены отрицательные результаты. Данные по каллусообразованию на различных вариантах среды Нича и Нич представлены в таблице (табл. 2).

Таблица 2.
Влияние фитогормонов модифицированной питательной среды Нича и Нич
на частоту каллусообразования в культуре пыльников орхидных *in vitro*

Виды	Концентрация фитогормонов в среде, мг/л			Частота каллусогенеза, %
	2,4-Д	ИМК	6-БАП	
<i>O. simia</i>	1,5	-	2,0	30,1 ± 1,2
<i>A. pyramidalis</i>	1,5	-	2,0	25,4 ± 0,9
<i>C. damasonium</i>	1,5	-	2,0	28,3 ± 0,7
<i>O. simia</i>	-	2,5	3,0	27,4 ± 1,1
<i>A. pyramidalis</i>	-	2,5	3,0	20,2 ± 0,6
<i>C. damasonium</i>	-	2,5	3,0	33,4 ± 1,8
<i>O. simia</i>	-	-	0,5	1,5 ± 0,5
<i>A. pyramidalis</i>	-	-	0,5	0,9 ± 0,2
<i>C. damasonium</i>	-	-	0,5	1,7 ± 0,6
<i>E. helleborine</i>	-	-	0,5	2,0 ± 0,4
<i>O. simia</i>	-	2,5	2,0	3,2 ± 0,6
<i>A. pyramidalis</i>	-	2,5	2,0	2,7 ± 0,4
<i>C. damasonium</i>	-	2,5	2,0	3,0 ± 0,3
<i>E. helleborine</i>	-	2,5	2,0	2,5 ± 0,6
<i>O. simia</i>	-	-	-	1,0 ± 0,4
<i>A. pyramidalis</i>	-	-	-	1,4 ± 0,7
<i>C. damasonium</i>	-	-	-	2,9 ± 0,8

При концентрации 2,4-Д 1,5 мг/л и 6-БАП 2,0 мг/л максимальная частота каллусообразования для пыльников *O. simia* составила 30,1 %, для *C. damasonium* показатель каллусогенеза составил 28,3 %, а для пыльников *A. pyramidalis* – 25,4 %.

При использовании концентрации ИМК 2,5 мг/л и 6-БАП 3,0 мг/л для *C. damasonium* количество образующих каллус пыльников составило 33,4 %. подобная зависимость прослеживается при высадке на данную модификацию среды пыльников *O. simia* – 27,4 % каллусообразующих эксплантов. Для данного варианта среды минимальный процент каллусообразования составил 20,2 % для пыльников *A. pyramidalis*.

Как видно из данных таблицы 2, при использовании только 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л процент каллусообразования составил 0,9 – 2,0 % у

КУЛЬТУРА ПЫЛЬНИКОВ ОРХИДНЫХ IN VITRO

исследованных видов. При использовании среды Нича и Нич с концентрациями ИМК 2,5 мг/л и 6-БАП 2,0 мг/л, процент каллусогенеза составил от 2,5 до 3,2 % у изученных видов. При использовании безгормональной среды количество пролиферирующих эксплантов составило от 1,0 до 2,9 %.

Таким образом, из полученных данных следует, что для получения каллусных культур из пыльников изученных видов необходимо использовать среду Нича и Нич, дополненную 2,4-Д 1,5 мг/л и 6-БАП 2,0 мг/л, или эту же среду, модифицированную ИМК 2,5 мг/л и 6-БАП 3,0 мг/л.

В результате проведенных исследований по подбору оптимальных условий культивирования была получена каллусная культура из пыльников пяти видов орхидных (рис. 1). Цитологический анализ этих культур показал ряд специфических особенностей. К ним относятся: 1) значительная структурная гетерогенность клеток, наличие различных типов образований, различающихся по морфологии; 2) связь морфологических признаков отдельных образований с их морфологическими потенциями.



Рис. 1. Каллусная культура из пыльников *Anacamptis pyramidalis* (L.) Rich

В каллусе также были обнаружены мелкие клетки, локализованные группами, с крупными ядрами, образующие меристематический очаг (рис. 2).

Появление меристематических очагов означало, что в каллусной ткани начались процессы вторичной дифференциации. Деление клеток меристематических очагов могло приводить к образованию лигнифицированных проводящих элементов сосудов и трахеид (рис. 3). Их образование аналогично ксилемогенезу у интактного растения и включает в себя стадии: рост клеток, вакуолезацию, отложение вторичной оболочки в условиях *in vitro*.

Другой путь морфогенеза в меристематических очагах – это спонтанный эмбриоидогенез. Каллусная клетка, ставшая на путь эмбриоидогенеза, относительно обособляется от окружающих клеток, ограничиваясь плотной оболочкой, увеличивается, сильно окрашивается. Обособившаяся клетка претерпевает строго направленные деления. В результате заложения ориентированных клеточных перегородок возникает четырехклеточная структура (тетрада), все клетки которой

располагаются линейно (рис. 4). В дальнейшем формировании эмбриоида принимают участие как апикальные, так и базальные клетки, появляется многоклеточный эмбриоид (рис. 5).

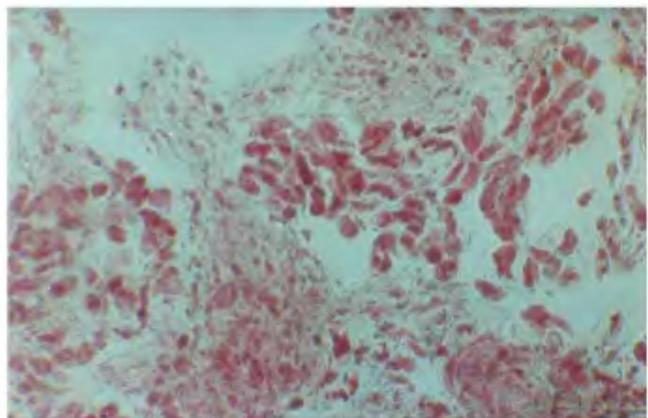


Рис. 2. Меристематические очаги в каллусной культуре *Orchis simia* Lam. (ув x 40, окраска ацетокармином).

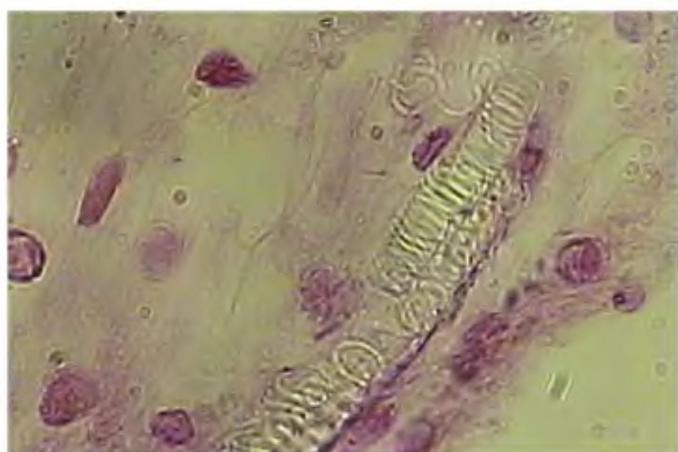


Рис. 3. Начало гистогенеза в каллусной культуре *Cephalanthera damasonium* (Mill) Druce. (ув x 90, окраска ацетокармином).

Нарушение развития эмбриоидов чаще всего выражается в неправильной ориентации клеточных перегородок при первых делениях относительно оси полярности. Это характерно как для апикальных клеток, так и для клеток, образующих подвесок. Часто базальная клетка делится раньше апикальной или не делится вообще. Во многих случаях наблюдается нарушение симметрии клеточных

КУЛЬТУРА ПЫЛЬНИКОВ ОРХИДНЫХ IN VITRO

делений и их асинхронность. Клеточные перегородки закладываются хаотично, во всех направлениях. Наблюдается также нарушение соотношения размеров клеток, образующих эмбриоид. Кроме того, восьмиклеточный подвесок, характерный для зародыша, обычно сильно редуцирован. Несмотря на большое количество нарушений в ходе эмбриоидогенеза, часть эмбриоидов развивается аналогично зиготическому зародышу, проходя те же стадии: предзародышевую стадию, глобулярную, торпедовидную. Таким образом, соматические эмбриоиды, полученные в культуре пыльников, могут быть использованы как исходный материал для размножения орхидей.



Рис. 4. Четырехклеточный эмбриоид в каллусной культуре *Orchis simia* Lam. (ув x 90, окраска ацетокармином).



Рис. 5. Многоклеточный эмбриоид в каллусной культуре *Orchis simia* Lam. (ув x 90, окраска ацетокармином).

ВЫВОДЫ

1. Определены оптимальные стериленты и режимы стерилизации для получения каллусной культуры из пыльников 5 видов орхидных крымской флоры.
2. Подобраны биологически активные вещества, питательная среда и условия культивирования пыльников орхидных *in vitro*.
3. Впервые получены каллусные культуры из пыльников орхидных в условиях *in vitro* и показано влияние биологически активных веществ на частоту каллусообразования.
4. Данна цитоморфологическая характеристика каллусных культур и показан их высокий морфогенетический потенциал, в связи с наличием меристематических очагов и соматических эмбриоидов.

Список литературы

1. Батыгина Т.Б. Пыльник как модель изучения морфогенетических потенций и путей морфогенеза // Эмбриология цветковых растений: Терминология и концепции. Т.1: Генеративные органы цветка / Ред. Т.Б.Батыгина. – С-Пб.: Мир и семья, 1994. – С. 120 – 121.
2. Крутлова Н.Н., Батыгина Т.Б., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы. – Уфа, 2005. – 230 с.
3. Vasil I., Nitch C. Experimental production of haploids and their uses // Ztschr. Pflanzenphysiol. – 1975. – Bd. 76. – S. 191 – 212.
4. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1988. – 170 с.
5. Дженсен У. Ботаническая гистохимия. – М.: Мир, 1965. – 378 с.
6. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
7. Крутлова Н.Н., Батыгина Т.Б. Методические рекомендации по использованию морфогенетического потенциала пыльника в биотехнологических исследованиях яровой пшеницы. – Уфа: ИБ УНЦ РАН, 2002. – 22 с.

*Теплицька Л.М., Шейко Е.А., Лобко В.М. Культура пилляків орхідних *in vitro* та її морфогенетичний потенціал //* Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2007. – Т. 20 (59). – № 3. – С. 79-86.

Отримано каллусні культури з пилляків 5 видів обхідних флори Криму. Показана залежність процесу калусогенезу від генотипу та фітогормонального складу поживного середовища. Цитоморфологічний аналіз каллусних культур показав їхній високий морфогенетичний потенціал, в зв'язку з присутністю меристематичних осередків, гистогенезу та ембріогенезу.

Ключові слова: обхідні, калусна культура, пилляки *in vitro*.

Teplitskaya L.M., Scheiko E.A., Lobko V.N. The culture of anther of Orchids in vitro and its morphogenetic potencial // Uchenye zapiski Tavricheskogo Natsionalnogo Universiteta im. V. I. Vernadskogo. Series «Biology, chemistry». – 2007. – V.20 (59). – № 3. – P.79-86.

Callus cultures from anther of 5 species of Crimean flora were gotten. It was shown the dependence of callusgenesis processis from genotype and phytohormonal composition of nutrient medium. Cytomorphological analysis of callus cultures showed their high morphogenetic potencial in connection with the presence of meristematic places of hystogenesis and embryogenesis.

Keywords: orchids, callus culture, anther *in vitro*.

Поступила в редакцию 12.07.2007 г.